

Naturwissenschaften 51, 42 (1964). — 13. GROBECKER, H., U. PIECHOWSKI und K. GREEFF, Med. exp. (Basel) 9, 273 (1963). — 14. BLOSTEIN, R., D. RUBINSTEIN und O. F. DENSTEDT, Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 1879 (1961). — 15. KLEINE, N. und H. SCHMITT, Blut 8, 145 (1962). — 16. FISKE, C. H. und Y. SUBBAROW, J. biol.

Chemistry 66, 375 (1925). — 17. HOFFMAN, J. F., D. C. TOSTESON und R. WHITTAM, Nature (London) 185, 186 (1960). — 18. SCHRIER, S. L. und L. S. DOAK, J. Clin. Invest. 42, 756 (1963). — 19. WOSEGIE, F., K. DOSE und H. FISCHER, Klin. Wschr. 40, 589 (1962).

Dr. H. Grobecker

Pharmakolog. Inst. der Universität

6 Frankfurt/Main-S 10, Ludwig-Rehn-Str. 14

Quantitative Bestimmung von 6β -Hydroxycortisol unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie mit Fluoreszenzindikator

Von K. BERTHOLD und HJ. STAUDINGER

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Eingegangen am 16. November 1965)

Eine neue Methode zur Bestimmung von 6β -Hydroxycortisol im menschlichen Harn wird beschrieben. Die Methode ist spezifisch, genügend genau und richtig und als Routineverfahren geeignet. Die Ausscheidung von 6β -Hydroxycortisol bei 20 gesunden Menschen (von 20—50 Jahren) wird bestimmt. Der Normalwert ist $530 \mu\text{g}/24 \text{ Std.} \pm 140 \mu\text{g}$. Nach Barbitursäuregaben sind die Ausscheidungen im allgemeinen zwar höher, sie liegen aber nicht außerhalb der Normalwertgrenzen.

A new method is described for the determination of 6β -hydroxycortisol in human urine. The method is specific and sufficiently accurate and suitable as a routine procedure. The excretion of 6β -hydroxycortisol was determined for 20 healthy adults (20—50 years). The normal value was $530 \mu\text{g}/24 \text{ hrs.} \pm 140 \mu\text{g}$. After the administration of barbituric acid, the excretion is generally higher, but it does not lie outside the range of normal values.

6β -Hydroxycortisol, das erstmals 1954 von BURNSTEIN, DORFMAN und NADEL (1), zunächst in Meerschweinchen-Harn und später auch in menschlichem Harn nachgewiesen werden konnte, wurde von FRANTZ, KATZ und JAILER, sowie ULSTROM und Mitarbeitern (2—5) in erhöhten Konzentrationen im menschlichen Urin bei normaler Schwangerschaft, bei Schwangerschaftstoxikosen, bei Neugeborenen und bei der Nebennierenrindenüberfunktion gefunden. Aus Rattenharn haben H. HERKEN und E. SEEGER 6β -Hydroxycorticosteron isolieren können (6).

Besondere Bedeutung erhielt die Bestimmung von 6β -Hydroxycortisol im Harn, nachdem CONNEY und KLUTCH (7) im Rahmen ihrer Untersuchungen zeigen konnten, daß durch Phenobarbital neben anderen mikrosomalen mischfunktionellen Oxygenasen in der Rattenleber auch die 6β -Steroid-Hydroxylase induziert wird. — Setzt man voraus, daß eine Aktivierung von mikrosomalen Enzymsystemen auch in der menschlichen Leber möglich ist, so könnte die 6β -Hydroxycortisol-Ausscheidung beim Menschen ein geeigneter Parameter für die mikrosomale Leberfunktion sein. Mit der von NISHIKAZE, ABRAHAM und STAUDINGER angegebenen Methode zur dünnschichtchromatographischen Fraktionierung von Corticosteroiden im Harn (8, 9) kann 6β -Hydroxycortisol nicht erfaßt werden. Seine relativ gute Löslichkeit in Wasser machte eine Erweiterung der von FRANTZ und Mitarbeitern (4) zur Isolierung von 6β -Hydroxycortisol angegebenen Verteilungsverfahren und eine Entwicklung anderer Laufmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie, als sie zur Isolierung der weniger polaren Harncorticosteroide notwendig sind (8, 9), erforderlich.

Setzt die Einführung der Dünnschichtchromatographie zur Fraktionierung von Corticosteroiden im Harn den

zeitlichen und methodischen Aufwand erheblich herab, so bietet die Verwendung des Kieselgel-HF₂₅₄ „Merck“, das einen Fluoreszenzindikator enthält, eine weitere methodische Vereinfachung. Die durch die Δ^4 -3-Keto-Gruppe des A-Ringes bedingte Löschung der Fluoreszenz auf der Dünnschichtplatte macht nach der Chromatographie eine unmittelbare Lokalisation des 6β -Hydroxycortisols möglich. Nachfolgend wird die Methode ausführlich dargestellt, da schon geringe methodische Abweichungen die Reproduzierbarkeit der quantitativen Bestimmung in Frage stellen.

Methodik

Extraktion

Der 24-Stdn.-Harn soll, um Verluste an 6β -Hydroxycortisol zu vermeiden, möglichst bald nach dem Sammeln aufgearbeitet werden. Man kann ihn jedoch auch bei -10 bis -15° einfrieren, wobei der 6β -Hydroxycortisolgehalt konstant bleibt.

$1/20$ eines 24-Stdn.-Harns wird mit Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt, mit Natriumsulfat (20% der Harnmenge) versetzt und zweimal mit dem doppelten Volumen Äthylacetat jeweils $1/2$ Std. geschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden dreimal mit 0,5 N-NaOH in 20-proz. Natriumsulfatlösung ($1/20$ des Extraktionsvolumens) und einmal mit aqua dest. ($1/100$ des Extraktionsvolumens) gewaschen, durch ein Faltenfilter in einen Rundkolben filtriert und bei 37 bis 40° unter Stickstoff eingedampft. Die Lösung des Rückstandes in 5 ml Methylenchlorid / Methanol (4:1) überführt man in ein 10 ml-Schliffröhrchen und dampft sie bei 37 bis 40° unter Stickstoff ein. Der Rückstand wird in 1 ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 8 ml methylenchloridgesättigtem Wasser etwa 3 Min. geschüttelt. Nach Zentrifugieren der entstandenen Emulsion trennt man die untere Phase ab, schüttelt den Überstand etwa 3 Min. mit 0,5 ml Methylenchlorid und zentrifugiert erneut. Die wäßrige Phase wird abgehebert und zweimal mit 50 ml wassergesättigtem Äthylacetat etwa 10 Min. extrahiert. Die beiden Phasen werden durch Zentrifugieren entmischt. Die vereinigten Extrakte dampft man im Rundkolben bei 37 bis 40° unter Stickstoff ein, überführt den Rückstand mit etwa 5 ml Methylenchlorid/Methanol (4:1) in ein Schliffröhrchen und verdampft das Lösungsmittel.

Dünnschichtchromatographie

Die mit Kieselgel HF₂₅₄ „Merck“ bestrichenen Dünnschichtplatten (Schichtdicke 0,25 mm) werden 12–15 Std. bei 100° aktiviert und dann über Blaugel aufbewahrt. Die Lösung des nach Extraktion erhaltenen Rückstandes in 0,2 ml Aceton/Äthanol (1:1) wird auf den Startpunkt einer Dünnschichtplatte aufgetragen. Man spült das Röhrchen noch zweimal mit je 0,1 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches aus und trägt auch diese Lösungen auf den Startpunkt auf. Beim Auftragen empfiehlt es sich, direkten Lichteinfall zu vermeiden.

Die Chromatographie erfolgt im Dunkeln in äquilibrierten Kammer. Die Platte mit dem Urinextrakt sowie eine Leerplatte werden in der ersten Dimension mit Cyclohexan/Isopropanol (50:50), in der zweiten Dimension mit Chloroform/Eisessig/Äthanol (65:30:5) entwickelt.

Anschließend reißt man in einem Betrachtungsgerät („UVANALYS“, Fa. W. Bälz, Heilbronn) bei UV-Licht von 254 m μ den Fleck des 6 β -Hydroxycortisols an, dessen Lage aus Abbildung 1 zu ersehen ist. Dieser Fleck liegt getrennt von anderen im UV-Licht sichtbaren, aber auch getrennt von den auf der HF-Platte nicht zu erkennenden hydrierten Corticosteroiden, die mit TTC-Blau auch eine Farbreaktion geben würden.

Spezifität

Die Identifizierung des aus Urin so isolierten Steroids als 6 β -Hydroxycortisol geschieht durch Vergleich mit chem. reinem 6 β -Hydroxycortisol¹⁾ als Referenzsubstanz. Die aus dem Urin isolierte Substanz gibt im Dünnschichtchromatogramm bei Verwendung verschiedener Laufmittelsysteme gleiche R_F -Werte wie reines 6 β -Hydroxycortisol:

Cyclohexan/Isopropanol (50:50) R_F = 0,61;
Chloroform/Eisessig/Äthanol (65:30:5) R_F = 0,16;
Benzol/Äthylacetat/Methanol (30:70:4) R_F = 0,37.

Auch im Papierchromatogramm (Laufmittel: heptanolgesättigtes Wasser) (10) geben beide Substanzen den gleichen R_F -Wert von 0,67.

Beide Substanzen geben das gleiche UV-Spektrum mit einem Maximum bei 236 m μ .

Außerdem wurde mit dem aus Urin präparativ gewonnenen 6 β -Hydroxycortisol ein IR-Spektrum aufgenommen, das mit dem Spektrum von authentischem 6 β -Hydroxycortisol übereinstimmt. Alle diese Versuche zeigen, daß die Methode *spezifisch* ist.

Quantitative Bestimmung

Der auf der Testplatte umrissene Fleck des 6 β -Hydroxycortisols sowie ein gleich großes Areal von gleicher Lage der Leerplatte werden abgeschabt. Man überführt das Kieselgel in je ein Schliff Röhrchen und schüttelt es mit 1,4 ml einer 0,05-proz. äthanolischen TTC-Blau-Lösung und 0,1 ml 6*N*-NaOH 30 Min. im Dunkeln. Es tritt Violettfärbung ein. Anschließend verdünnt man mit 3 ml aqua dest. und schüttelt 1 Min. mit 4 ml Benzol. Nach Zentrifugieren hebert man die violett gefärbte Benzolphase ab. Die wäßrige Phase wird noch zweimal mit je 3 ml Benzol nachextrahiert. Die Benzol-auszüge werden in einem 10-ml-Meßkölbchen vereinigt, das dann mit Benzol bis zur Marke aufgefüllt wird. Die Extinktion der Benzol-Farblösung wird im Photometer „Eppendorf“ mit Filter 578 in 4-cm-Küvetten gegen den Leerwert gemessen.

Eichung

Man stellt eine Stammlösung von 500 μ g 6 β -Hydroxycortisol in 5 ml Aceton/Äthanol (1:1) her, pipettiert 0,05, 0,2, 0,35 und 0,5 ml dieser Lösung in Schliff Röhrchen und dampft das Lösungsmittel unter Stickstoff ab. Als Leerwert werden 0,5 ml Aceton/Äthanol (1:1) ebenfalls in einem Schliff Röhrchen eingedampft. Anschließend wird die TTC-Blau-Reaktion in der oben beschriebenen Form durchgeführt. Es wurden Mehrfachbestimmungen gemacht.

¹⁾ Herrn Dr. OSWALD H. GANLEY, Fa. Merck Sharp & Dohme, Rahway, New Jersey, USA danken wir für die freundlich überlassene Probe.

2. Chloroform-Eisessig-Äthanol (65:30:5) →

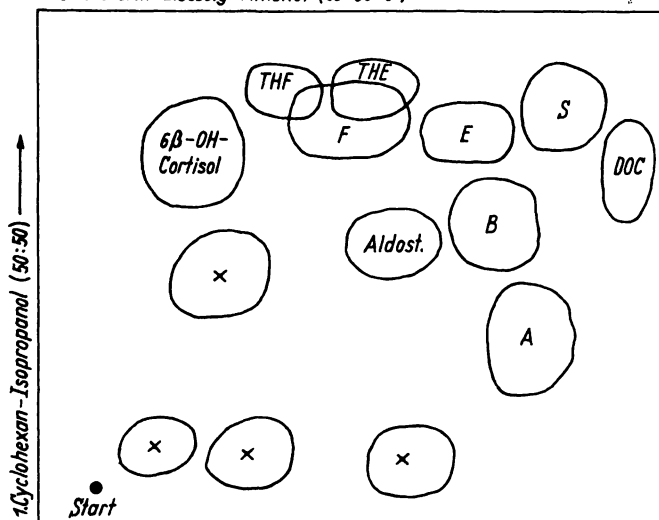


Abb. 1

Dünnschichtchromatographische Abtrennung von 6 β -Hydroxycortisol aus Urinextrakt auf einer mit Kieselgel-HF beschickten Platte

THF = Tetrahydrocortisol, THE = Tetrahydrocortison, F = Cortisol, E = Cortison, S = 17 α -Hydroxycortexon, DOC = Cortexon, Aldost. = Aldosteron, B = Corticosteron, A = 11-Dehydrocorticosteron, x = unbekannte, nicht identifizierte Flecke

Tab. 1
Eichung der Methode

		6 β -Hydroxycortisol			
	5 μ g	20 μ g	35 μ g	50 μ g	
log I ₀ /I	0,106	0,440	0,805	1,154	
	0,110	0,435	0,782	1,157	
	0,107	0,432	0,803	1,188	
	0,106	0,436	0,808	1,186	
	0,096	0,444	0,783	1,153	
Mittel	0,105	0,437	0,796	1,168	

Richtigkeit der Methode

Wir bestimmten von verschiedenen Urinen den Gehalt an 6 β -Hydroxycortisol. Anschließend versetzte man die gleichen Urine mit 0,2 bzw. 0,35 ml der Stammlösung (20 bzw. 35 μ g 6 β -Hydroxycortisol) und bestimmte erneut den Gehalt an 6 β -Hydroxycortisol. Die wiedergefundenen Mengen des zugesetzten Steroids sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Es darf danach für die 6 β -Hydroxycortisol-Bestimmung im Bereich von 20–35 μ g mit einer Wiederfindung von 64% gerechnet werden.

Genauigkeit der Methode

Zwei Urine werden mehrmals analysiert. Die dabei erhaltenen Werte sind in Tabelle 3 enthalten. Da die Streuung relativ groß ist, empfiehlt es sich, die 6 β -Hydroxycortisolgehalte stets doppelt zu bestimmen.

Ergebnisse

Individuelle biologische Streuung

Für eine männliche Versuchsperson wurde an Hand der 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung an 20 willkürlich gewählten Tagen die individuelle Schwankungsbreite bei einem Mittelwert von 566 μ g/24 Std. und einer Standardabweichung von $s = \pm 123$ mit 320–810 μ g/

Tab. 2
Wiederfindung von zugesetztem 6 β -Hydroxycortisol im Harn
(Werte in μg)

	6 β -Hydroxycortisol zugesetzt	
	20 μg	35 μg
wiedergefunden:	13,4 13,0 12,3 12,0 13,2	22,2 23,1 22,0 — —
Mittel	12,8 = 64,0%	22,4 = 64,1%

Tab. 3
Genauigkeit bei Mehrfachbestimmung

Mischharn 1 6 β -Hydroxycortisol $\mu\text{g}/1000 \text{ ml}$	Mischharn 2 6 β -Hydroxycortisol $\mu\text{g}/1000 \text{ ml}$
492	1193
590	1278
495	1188
601	1192
564	1175
559	1152
—	1110
—	1163
M = 550 s = ± 46	M = 1181 s = ± 48

24 Stdn. bestimmt. Mengen von 1469 μg , 1010 μg , 1180 μg 6 β -Hydroxycortisol, die bei derselben Versuchsperson nach körperlichen Anstrengungen gefunden wurden, lagen signifikant außerhalb der individuellen biologischen Schwankungsbreite. Eine Abhängigkeit der 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung von der Menge des 24-Stdn.-Harns besteht *nicht*.

Für eine *weibliche* Versuchsperson war die individuelle Schwankungsbreite 105—929 μg 6 β -Hydroxycortisol/Tag. Eine Korrelation zwischen 6 β -Hydroxycortisol einerseits und 17-Ketosteroiden sowie Gesamtcorticosteroiden andererseits konnte auf Grund der wenigen Parallelbestimmungen zwar vermutet, nicht aber gesichert werden.

Stets wurde durch Kreatininbestimmung die Genauigkeit, mit der die tägliche Urinmenge gesammelt worden ist, überprüft und damit auch eine Auswahl der auf ihren 6 β -Hydroxycortisol-Gehalt zu untersuchenden Urine getroffen.

Biologische Streuung von Kollektiven

Um die Streuung bei einem Kollektiv gesunder Menschen zu bestimmen, haben wir 6 β -Hydroxycortisol im Harn von je 10 Männern und Frauen zwischen 20 und 50 Jahren bestimmt und mit der Ausscheidung von 17-Ketosteroiden und Gesamtcorticoiden verglichen (vgl. Tab. 4).

Tab. 4
Biologische Streuung der Corticosteroid-Ausscheidung im 24-Stdn.-Harn

Alter	ml Urin	Männer		
		6 β -Hydroxycortisol μg	17-Ketosteroide*) mg	Gesamtcorticoide*) mg
28	1440	516	23,0	8,7
20	840	540	14,9	4,0
28	1090	478	29,5	4,9
29	1180	620	21,6	10,7
50	1830	344	11,9	9,0
36	1900	546	21,6	8,2
29	920	779	27,4	9,8
27	830	388	20,1	5,5
35	520	585	7,2	3,3
24	680	450	—	—
M _M		525 (s = ± 123)	19,9	7,1
		Frauen		
		6 β -Hydroxycortisol μg	17-Ketosteroide*) mg	Gesamtcorticoide*) mg
20	1420	634	25,2	12,8
25	600	836	10,0	3,2
20	1070	506	16,5	8,0
32	900	516	8,8	—
50	520	316	4,4	3,6
43	920	474	7,9	5,1
23	1100	554	12,2	8,4
21	860	300	13,9	4,3
23	740	597	14,8	6,8
44	800	607	7,8	6,8
M _F		534 (s = ± 156)	12,1	6,6

*) Die 17-Ketosteroide wurden nach ZIMMERMANN (11), die Corticoide nach STAUDINGER und Mitarbeitern bestimmt (12).

Bei einer mittleren täglichen 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung der männlichen Probanden von $M_M = 525 \mu\text{g}$ und einer Standardabweichung von $s = \pm 123$ ist die biologische Schwankungsbreite 279–771 μg .

Weibliche Probanden haben bei einer mittleren täglichen 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung von $M_F = 534 \mu\text{g}$ und einer Standardabweichung von $s = \pm 156$ eine biologische Schwankungsbreite von 222–846 μg .

Ein signifikanter Unterschied zwischen männlichem und weiblichem Kollektiv in bezug auf die mittlere tägliche Ausscheidung und auf die biologische Streuung von 6 β -Hydroxycortisol ist nicht gegeben. Ebenso besteht keine Abhängigkeit zwischen der täglichen 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung und der Urinmenge pro Tag sowie dem Alter des Probanden. Wegen der geringeren Anzahl der Untersuchungen kann eine Korrelation von 6 β -Hydroxycortisol, 17-Ketosteroiden und Gesamtcorticoiden nicht als gesichert angesehen werden.

Diskussion

Zur Extraktion

Wir verwenden für die Extraktion nur $\frac{1}{20}$ des 24-Stdn.-Urins. Diese Menge ist wesentlich niedriger als bei anderen Methoden zur Bestimmung von 6 β -Hydroxycortisol (4, 13). Um die bei der Extraktion von 6 β -Hydroxycortisol aus Urin benutzten Lösungsmittelsysteme zu beurteilen, ist die Kenntnis von deren Verteilungskoeffizienten erforderlich:

Äthylacetat/20-proz. Natriumsulfatlösung	11,5
Wasser/Methylenchlorid	13,6
Äthylacetat/Wasser	1,13

Unter Berücksichtigung dieser Verteilungskoeffizienten gestattet die Anwendung der aufgeführten Systeme, in der im methodischen Teil dieser Arbeit angegebenen Form, die annähernd quantitative Extraktion von 6 β -Hydroxycortisol aus Urin.

Zur Dünnschichtchromatographie

Statt der von anderen Autoren (2, 7) benutzten Papierchromatographie und statt der bei uns bisher gebräuchlichen dünnschichtchromatographischen Trennung von Corticosteroiden auf Kieselgel-G-Platten (8, 9) benutzen wir bei diesem Verfahren die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel-HF „Merck“ als Trägermaterial. Dem Kieselgel-HF ist ein Fluoreszenzindikator zugesetzt, der im kurzwelligen

UV-Licht eine grünliche Fluoreszenz hervorruft. Da diese Fluoreszenz durch Steroide mit der Δ^4 -3-Keto-Gruppe gelöscht wird, ist eine unmittelbare Lokalisation dieser Steroide, speziell des 6 β -Hydroxycortisols, möglich (ohne die bisher zur Lokalisation notwendige TTC-Blau-Reaktion mit der α -Ketol-Seitenkette vornehmen zu müssen).

Wiederfindung und biologische Schwankungsbreite

Eine Wiederfindungsrate von 64% 6 β -Hydroxycortisol mit der vorliegenden Methode entspricht der Wiederfindung, wie sie mit anderen Methoden ebenfalls erreicht wird (4). — Die von uns festgestellten biologischen Schwankungsbreiten, die für gesunde Männer 279 bis 771 μg und für gesunde Frauen 222–846 μg betragen, sind nur bedingt mit den höchsten bzw. niedrigsten 6 β -Hydroxycortisol-Einzelwerten kleinerer Kollektive (2, 3) vergleichbar. Die Mittelwerte der von uns untersuchten Kollektive liegen mit 525 μg für Männer und mit 534 μg für Frauen eindeutig höher als vergleichbare Mittelwerte anderer Arbeiten (2, 3).

Bedeutung der Methode

Als Anwendungsgebiet für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode, die gegenüber anderen Methoden durch ihren geringen apparativen und zeitlichen Aufwand Vorteile bietet, sind Untersuchungen über die Abhängigkeit der 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung von der durch Phenobarbital bedingten Aktivierung der lebermikrosomalen 6 β -Steroidhydroxylase beim Menschen vorgesehen. Bisher von uns durchgeführte Einzeluntersuchungen nach Gabe eines Barbitursäurederivates zeigen zwar jeweils einen deutlichen Anstieg der 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung, liegen jedoch nicht signifikant außerhalb der biologischen Schwankungsbreite. Auch BURNSTEIN und KLAIBER (13) konnten bei fünf mit Phenobarbital behandelten Patienten eine Erhöhung der Ausscheidung von 6 β -Hydroxycortisol feststellen, geben aber keine Absolutwerte an, so daß ein Vergleich mit unseren Untersuchungsergebnissen nicht möglich ist. Die Sicherung dieser ersten wenigen Ergebnisse einer Steigerung der 6 β -Hydroxycortisol-Ausscheidung beim Menschen nach Gaben von Barbitursäurederivaten muß weiteren eingehenderen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Wir danken der „Research Corporation, New York, USA“ und dem „Fonds der Chemie“ für die gewährte Unterstützung.

Literatur

1. BURNSTEIN, S., R. J. DORFMAN und E. M. NADEL, Arch. Biochem. Biophysics 53, 307 (1954); BURNSTEIN, S. und E. M. NADEL, J. biol. Chemistry 213, 597 (1955). — 2. FRANTZ, A. G., F. H. KATZ und J. W. JAILER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 105, 41 (1960). — 3. KATZ, F. H., M. M. LIPMAN, A. G. FRANTZ und J. W. JAILER, J. Clin. Endocr., Springfield 22, 71 (1962). — 4. FRANTZ, A. G., F. H. KATZ und J. W. JAILER, J. Clin. Endocr., Springfield 21, 1290 (1961). — 5. ULSTROM, R. A., E. COLLÉ, J. BURLEY und R. GUNVILLE, J. Clin. Endocr., Springfield 20, 1080 (1960). — 6. HERKEN, H. und E. SEEBER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol.

Pharmakol. 244, 442 (1963). — 7. CONNEY, A. H. und A. KLUTCH, J. biol. Chemistry 238, 1611 (1963). — 8. NISHIKAZE, O., R. ABRAHAM und H. J. STAUDINGER, J. Biochem. 54, 427 (1963). — 9. NISHIKAZE, O. und H. J. STAUDINGER, Klin. Wschr. 40, 1014 (1962). — 10. SCHMIDT, H. und H. J. STAUDINGER, Biochem. Z. 324, 128 (1953). — 11. ZIMMERMANN, W. und D. PONTIUS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 297, 157 (1954). — 12. RAFTOPOULOU, R., H. J. STAUDINGER und L. WEISSBECKER, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 4, 463 (1959). — 13. BURNSTEIN, S. und E. L. KLAIBER, J. Clin. Endocr. 25, 293 (1965).

Professor Dr. H. J. Staudinger, 63 Gießen, Friedrichstr. 24